

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 juillet 2001 (26.07.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/52840 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/352, 35/78, A61P 13/08, 17/10, 17/14

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00170

(22) Date de dépôt international :
18 janvier 2001 (18.01.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/00573 18 janvier 2000 (18.01.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **LABORATOIRES PHARMASCIENCE** [FR/FR]; 73, boulevard de la Mission Marchand, F-92400 Courbevoie (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **MSIKA, Philippe** [FR/FR]; 226, rue Marcadet, F-75018 Paris (FR). **PICCIRILLI, Antoine** [FR/FR]; 39, avenue des Etats-Unis, F-78000 Versailles (FR).

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF ISOFLAVONES AND/OR PRUNUS AFRICANA EXTRACTS FOR PREPARING A COMPOSITION DESIGNED TO INHIBIT 5 α -REDUCTASE ACTIVITY, IN PHARMACOLOGY PARTICULARLY IN DERMATOLOGY, IN COSMETICS AND AS FOOD ADDITIVE

(54) Titre : UTILISATION D'ISOFLAVONES ET/OU D'EXTRAITS DE PRUNIER D'AFRIQUE POUR LA PREPARATION D'UNE COMPOSITION DESTINÉE A INHIBER L'ACTIVITÉ DE LA 5 α -REDUCTASE, EN PHARMACIE NOTAMMENT EN DERMATOLOGIE, EN COSMETIQUE ET EN TANT QU'ADDITIF ALIMENTAIRE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least a product selected from the group consisting of isoflavones, prunus africana extracts and the mixtures thereof for preparing a composition designed to inhibit 5 α -reductase activity. Said use produces a remarkable inhibiting effect of 5 α -reductase activity thereby providing a novel response for treating dermatological pathologies and/or disorders related to congenital or acquired exaggeration of 5 α -reductase activity, in particular for treating prostatic hypertrophy, prostatic adenoma, acne, hyperseborrhea, alopecia and hirsutism. The invention also concerns cosmetic treatment methods, in particular for greasy skin, and the use of said products as additives for a food product for human or animal consumption.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à l'utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase. Cette utilisation permet d'obtenir un effet remarquable d'inhibition de l'activité de la 5 α -réductase procurant ainsi une nouvelle réponse pour le traitement des pathologies et/ou désordres dermatologiques liés à une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5 α -réductase, notamment pour le traitement de l'hypertrophie prostatique, de l'adénome prostatique, de l'acné, de l'hyperseborrhée, de l'alopécie et de l'hirsutisme. L'invention se rapporte également à des méthodes de traitement cosmétique, notamment de la peau grasse, ainsi qu'à l'utilisation de ces produits décrits en tant qu'additifs dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal.

WO 01/52840 A1

Utilisation d'isoflavones et/ou d'extraits de prunier d'Afrique pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase, en pharmacie notamment en dermatologie, en cosmétique et en tant qu'additif alimentaire.

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'au moins un produit choisi
5 dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase, notamment pour le traitement de l'hypertrophie prostatique, de l'adénome prostatique, de l'acné, de l'hyperséborrhée, de l'alopécie, de l'hirsutisme.

10 L'invention se rapporte également à des méthodes de traitement cosmétique, notamment de la peau grasse, ainsi qu'à l'utilisation des produits décrits en tant qu'additifs dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal.

La 5 α -réductase est une enzyme microsomiale NADPH dépendante qui existe sous forme de deux isoenzymes synthétisées à partir de deux gènes différents.

15 L'isoenzyme de type 1 de la 5 α -réductase est retrouvée essentiellement dans le foie et la peau, plus particulièrement dans les glandes sébacées de la peau non génitale et du cuir chevelu, et apparaît à la puberté. L'isoenzyme de type 2 est prédominante dans la prostate et au niveau de la peau des territoires sexuels différenciés : région génitale, barbe, et joue un rôle dans la différenciation sexuelle. La répartition des
20 isoenzymes de type 1 et 2 de la 5 α -réductase au niveau de la peau et des annexes cutanées chez l'homme peut être illustrée par le tableau 1 ci-après.

Il existe un certain nombre de pathologies pour lesquelles une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5 α -réductase est responsable en totalité ou en majorité des troubles observés.

25 Par exemple, chez l'homme, cette enzyme 5 α -réductase, principalement localisée dans les tissus génitaux et dans la peau, catalyse l'hydroxylation de la testostérone en 5 α -réductase dihydrotestostérone (DHT). Or, comme la DHT est un androgène bien plus actif que la testostérone (environ 2 fois plus), les effets de cette dernière sont amplifiés dans les tissus où est produite la DHT. Une activité trop élevée
30 de la 5 α -réductase provoque ainsi des teneurs en androgène sous forme de DHT trop élevées dans la prostate, d'où une surstimulation de cette dernière se traduisant en une

croissance indésirable pouvant mener à la pathologie de l'hypertrophie prostatique, voire à l'adénome prostatique, nécessitant le plus souvent une intervention chirurgicale.

5 **Tableau 1 : répartition des isoenzymes de type 1 et 2 de la 5 α -réductase au niveau de la peau et des annexes cutanées chez l'homme**

		H5- α 1	H5- α 2
EPIDERME	Couche basale	++	+
	Couche spinieuse	+	++
	Couche granuleuse	+	-
	Couche cornée	-	-
DERME	Fibroblastes	++	-
GLANDES SEBACEES	Cellules basales	++	+
	Cellules glandulaires	++	-
GLANDES SUDORALES ECCRINES	Canal excréteur	-	-
	Cellules sécrétrices	++	-
	Cellules myoépithéliales	++	+
FOLLICULE PILEUX	Papille dermique	+	+ ?
	Cellules de la matrice	++	+
	Gaine épithéliale interne	\pm	+++
	Gaine épithéliale externe	++	-
	Muscle arrecteur	+	-

D'autres pathologies, de type dermatologique, peuvent être observées chez l'homme ou la femme comme résultant d'une suractivité de la 5 α -réductase à savoir, en particulier l'acné, l'hirsutisme ou encore l'alopecie.

Dans la peau, l'activité de la 5 α -réductase est plus importante dans la glande sébacée que dans les autres structures. Par ailleurs, les glandes séborrhéiques montrent une activité 5 α -réductase plus importante que celles des autres territoires cutanés. Par conséquent, le niveau de sécrétion sébacée physiologique semble étroitement lié à l'activité de cette enzyme.

Chez l'acnéïque, il existe une hyperactivité de la 5 α -réductase. Plus qu'une augmentation des taux sériques des androgènes, c'est une augmentation des précurseurs en DHT, facteur principal de la fonction sébacée, qui participent à l'acné.

La peau grasse ou (séborrhée), outre son aspect disgracieux, constitue un terrain sur lequel peuvent survenir des complications. Elle atteint les zones où les glandes sébacées sont nombreuses et résulte principalement d'une surstimulation androgénique de la production sébacée par ces glandes spécifiques. L'hyperséborrhée participe à la survenue des lésions d'acné vulgaire.

Dans le cuir chevelu, on retrouve l'isoenzyme de type 1 de la 5 α -réductase au niveau des glandes sébacées, ainsi qu'au niveau du follicule pileux. L'isoenzyme de type 2 de la 5 α -réductase est localisée majoritairement au niveau de la gaine épithéliale interne, ainsi qu'au niveau de la papille dermique du cheveu. Cependant cette dernière localisation reste à préciser.

L'alopecie androgénique, dont la physiopathogénie est très voisine de celle de l'acné, est la plus fréquente des alopecies et sans doute celle où la demande de thérapeutique est la plus forte. La 5 α -réductase semble jouer un rôle primordial dans cette pathologie. En effet, les hommes atteints d'un déficit génétique en isoenzyme de type 2 de la 5 α -réductase ne développent pas d'alopecie androgénétique.

Compte tenu de ce qui précède, la recherche s'est orientée vers la mise au point d'inhibiteurs de la 5 α -réductase. Certains stéroïdes comme la progestérone ont été testés dans ce sens, mais sa métabolisation rapide la rend inefficace *in vivo*. Pour être actif, l'inhibiteur de 5 α -réductase doit être suffisamment stable pour bloquer l'activité de l'enzyme *in vitro*. Le finastéride, inhibiteur compétitif stéroïdien, remplit cette condition, mais il est plus actif sur l'isoenzyme de type 2 que sur l'isoenzyme de type 1 et ces deux isoenzymes n'ont que 50 % d'homologie sur la séquence de leurs acides aminés. C'est donc surtout dans l'hyperplasie bénigne de la prostate que le finastéride a déjà été testé.

Par ailleurs, on connaît également l'extrait de *Serenoa Repens*, comme référence en tant qu'inhibiteur de la 5 α -réductase, l'extrait de *Serenoa Repens* présentant l'avantage, par rapport au finastéride, d'une origine naturelle en tant qu'extrait végétal permettant une meilleure comparaison pour des produits testés

également d'origine naturelle. *Serenoa Repens*, également connu sous la dénomination *Sabal serrulatum*, est un petit palmier que l'on peut trouver aux Etats-Unis (Floride) en Afrique du Nord et en Espagne.

On a maintenant trouvé de manière tout à fait surprenante et inattendue que l'utilisation de certains composés d'origine végétale permet d'obtenir un effet remarquable d'inhibition de l'activité de la 5 α -réductase de type 1 procurant ainsi notamment une nouvelle réponse pour le traitement des pathologies et/ou désordres dermatologiques évoqués ci-dessus.

La présente invention se rapporte ainsi à l'utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase de type 1

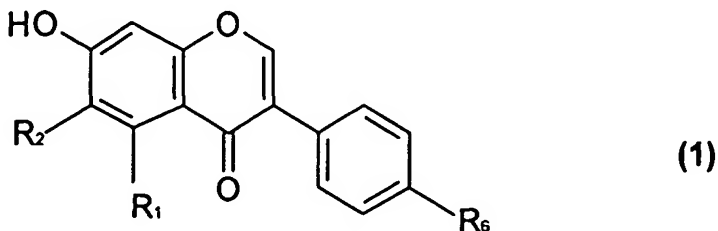
Selon l'invention, l'expression "et les mélanges de ces derniers" ci-dessus englobe bien entendu en particulier des mélanges d'isoflavones, des mélanges d'extraits de prunier d'Afrique ou encore des mélanges d'isoflavones(s) et d'extrait(s) de prunier d'Afrique.

En particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition est destinée à inhiber l'isoenzyme de type 1 de la 5 α -réductase

Les isoflavones utilisables selon l'invention peuvent être obtenues par synthèse chimique ou sont des substances naturelles extraites de produits naturels, notamment à partir des végétaux. Les isoflavones utilisables peuvent aussi être un mélange d'isoflavones d'origine naturelle et synthétique.

On distingue les formes aglycones des isoflavones et les formes glycosylées de ces dernières. Ces diverses formes sont illustrées par les formules suivantes.

Formes aglycones, de formule :



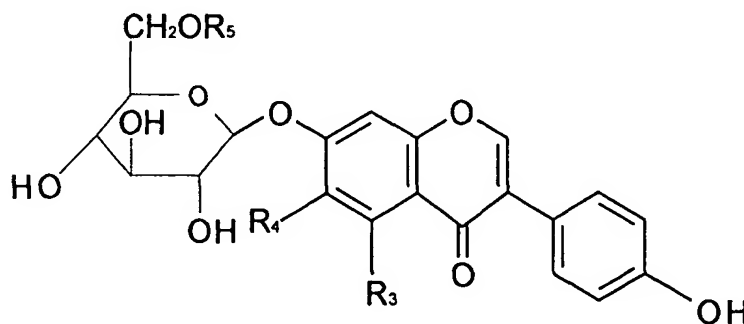
dans laquelle R1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxy, R2 représente un atome d'hydrogène ou un groupe methoxy et R6 représente un groupe hydroxy ou un groupe méthoxy.

Plus particulièrement, R1, R2 et R6 peuvent prendre les significations suivantes :

5

	<u>R1</u>	<u>R2</u>	<u>R6</u>	<u>Nom du composé</u>
	H	H	OH	Daidzeine
	OH	H	OH	Genisteine
	H	OCH ₃	OH	Glyciteine
10	H	H	OCH ₃	Formononectine
	OH	H	OCH ₃	Biochanine A

Formes glycosylées, de formule :



(II)

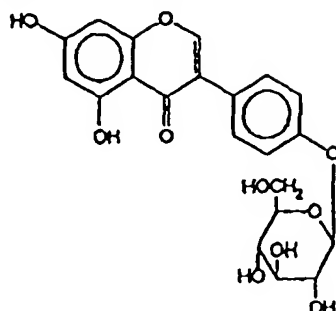
15 dans laquelle R3, R4 et R5 représentent :

	<u>R3</u>	<u>R4</u>	<u>R5</u>	<u>Nom du composé</u>
	H	H	H	Daidzine
	OH	H	H	Genistine
	H	OCH ₃	H	Glycitine
20	H	H	COCH ₃	Acetyldaidzine
	OH	H	COCH ₃	Acetylgenistine
	H	OCH ₃	COCH ₃	Acetylglycitine
	H	H	COCH ₂ COOH	Malonyldaidzine
	OH	H	COCH ₂ COOH	Malonylgenistine
25	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH	Malonylglycitine

On peut encore citer :

- la génistéin-4'-O-glucoside de formule :

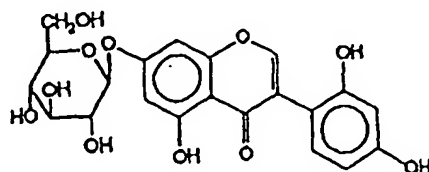
5



(III)

- la 2'-hydroxygénistéin-7-O-glucoside de formule :

10

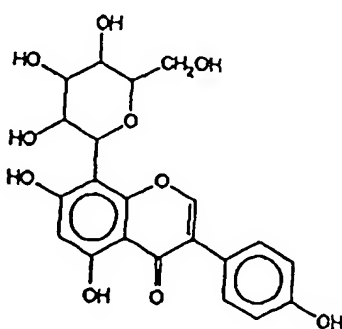


(IV)

15

- la génistéin-C-8-glucoside de formule :

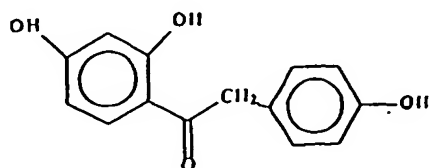
20



(V)

- la 2, 4, 4'-trihydroxydeoxybenzoine (THB) de formule :

25



(VI)

On préfère dans le cadre de la présente invention les isoflavones de forme aglycone, de
30 formule (I) telle que définie ci-dessus.

Les formes glycosylées des isoflavones sont hydrolysées sous l'action des béta-glucosidases. Les formes glycosylées (daidzine et génistine) et acylées sont les plus abondantes. Une hydrolyse acide chimique ou enzymatique peut transformer ces formes conjuguées en daidzéine et genistéine, plus absorbables.

- 5 L'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les isoflavones synthétiques ou d'origine naturelles, du groupe constitué par les génistine, daidzine, glycitine, acétyldaidzine, acétylgenistine, acétylglycitine, malonyldaidzine, malonylgénistine, malonylglycitine, la 2,4,4'-trihydroxydeoxybenzoïne (THB), la daidzéine, la génistéine, la glycitéine, la
10 formononectine, la biochanine A, la génistéin-4'-O-glucoside, la 2'-hydroxygénistéin-7-O-glucoside, la génistéin-C-8-glucoside, et les mélanges de ces derniers.

On préfère tout particulièrement utiliser selon l'invention un produit choisi dans le groupe constitué par la génistine, la génistéine et les mélanges de ces derniers.

- On ne connaît pas de sources naturelles aussi riches en isoflavones que le
15 soja. Les méthodes de purification des isoflavones à partir de produits du soja, notamment les graines, les germes de soja (ou "soja germé"), les laits de soja dont broyats et mélasses et les produits fermentés (en particulier Tofu et Tempeh) sont bien connues de l'homme du métier.

- Le tableau 2 suivant illustre les teneurs en isoflavones
20 (microgrammes/gramme) dans des graines de soja de récoltes de l'Iowa (Wang et Murphy, "Isoflavone composition of American and Japanese Soybeans in Iowa : effects of variety, crop year, and location", J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 1674-1677).

Tableau 2 : exemple de teneurs en isoflavones dans des graines de soja

Formes aglycones	µg/g d'extrait sec
Daidzeine	7-60
Genisteine	17-56
Glyciteine	20-24
Formes glycosylées	
Daidzine	180-780
Genistine	325-850
Glycitine	53-70
6"-O-malonyldaidzine	121-410
6"-O-malonylgenistine	290-958
6"-O-malonylglycitine	61-72
6"-O-acetyldaidzine	tr
6"-O-acetylgenistin	2-10
6"-O-acetylglycitine	23-36

Le soja germé est la source de soja la plus riche en isoflavones.

Concernant le lait de soja, il est traditionnellement obtenu à chaud par
5 broyage des graines après dépelliculage, en milieu alcalin. Un traitement thermique est effectué pour inhiber les facteurs antitrypsiques.

Les quantités d'isoflavones présentes dans les laits de soja sont variables. Le tableau 3 suivant est une illustration des teneurs en isoflavones des laits de soja.

Tableau 3 : exemple de teneurs en isoflavones dans des laits de soja

Formes aglycones	$\mu\text{g/g}$ d'extrait sec.	mg/l de soja
Daidzeine	18	1,4
Genisteine	19	1,5
Glyciteine	10	0,8
Formes glycosylées		
Daidzine	410	33
Genistine	710	57
Glycitine	65	5
6"-O-malonyldaidzine	690	55
6"-O-malonylgenistine	871	70
6"-O-malonylglycitine	39	3
6"-O-acetyldaidzine	22	18
6"-O-acetylgenistine	820	66
6"-O-acetylglycitine	89	7

5

Les broyats ou mélasses résultant de la production du lait de soja représentent également une source d'isoflavones de soja.

Par "extraits d'isoflavones de soja", on entend ainsi selon l'invention les extraits d'isoflavones de soja obtenus à partir des différents produits du soja décrits ci-dessus (graines, germes de soja (ou "soja germé"), les laits de soja dont broyats et
10 mélasses et les produits fermentés (en particulier Tofu et Tempeh)), extraits qui ont éventuellement été purifiés et/ou concentrés pour augmenter leurs teneurs en isoflavones, selon des méthodes bien connues de l'homme du métier.

L'utilisation selon l'invention est ainsi également caractérisée en ce que ledit
15 produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du soja.

On peut en particulier citer l'extrait d'isoflavones de soja commercialisé par la Société Nutrinov sous la dénomination Genosten 4000^R. Il s'agit d'un extrait soluble de soja enrichi en isoflavones obtenu après concentration par évaporations successives des mélasses de soja. Ce procédé ne fait appel à aucun solvant organique. On trouvera
5 des données analytiques sur ce produit dans les exemples ci-après.

Le lupin (*lupinus*) est également une source naturelle intéressante en isoflavones. On peut citer en particulier la variété du "lupin jaune" dans les tiges duquel ont notamment été identifiées les isoflavones glycosylées génistine, 2'-hydroxygénistéin-7-0-glucoside, génistéin-4'-0-glucoside et la génistéin-C-8-glucoside
10 dont les formules respectives sont décrites ci-dessus (Rafal Franski et al, "Application of mass spectrometry to structural identification of flavonoid monoglycosides isolated from shoot of lupin (*lupinus luteus* L.)", Acta Biochimica Polonica, vol. 46, N° 2/1999, 459-473).

L'utilisation selon l'invention est ainsi également caractérisée en ce que le
15 produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du lupin c'est-à-dire, par analogie avec la définition ci-dessus pour les extraits d'isoflavones du soja, parmi les extraits d'isoflavones pouvant être obtenus à partir des produits du lupin.

Les extraits de prunier d'Afrique ou "*Pygeum Africanum*" sont bien connus de l'homme du métier. Ils sont principalement issus de l'écorce du prunier
20 d'Afrique. Il s'agit d'extraits stéroliques de prunier d'Afrique, tel que celui commercialisé par la société Euromed sous la dénomination "*Pygeum*". L'extrait de prunier d'Afrique dont l'utilisation est un objet de la présente invention présente la répartition en poids en acide gras suivante : de 30 à 40% en acide oléique, de 7 à 12% en acide linoléique, de 40 à 55% en acide palmitique et inférieur à 3% en acide
25 linoléique. La teneur en stérols est comprise entre 13 et 18% et l'indice acide global de l'extrait est inférieur à 45.

On préfère tout particulièrement l'extrait de prunier qui se caractérise en outre par une teneur relative en β -sitostérol de 65 à 80%.

On préfère, dans le cadre de la présente invention, l'extrait de prunier qui se
30 caractérise en outre par une teneur en insaponifiable de 15 à 18%. On préfère tout

particulièrement l'extrait de prunier qui se caractérise en outre par une teneur en β -sitostérol de 65 à 80%.

L'extrait de prunier convenant à l'utilisation selon la présente invention peut par exemple présenter les spécifications suivantes :

5

Extrait de prunier d'Afrique	
Répartition en acides gras (en %)	
Acide oléique C18'	30 à 40
Acide linoléique C18"	7 à 12
Acide linolénique C18'''	< 3
Acide stéarique C18	3 à 7
Acide palmitique C16	40 à 55
Indice d'acide	35 à 45
Teneur en insaponifiable (wt%)	15 à 18
Squalène (wt%)	< 0.3
Stérols totaux (wt%)	13 à 18
Dont bêta sitostérol (% relatif)	65 à 80
Dérivés phénoliques (ppm)	> 5000

On utilise en particulier selon l'invention le produit tel que décrit ci-dessus, sous forme d'isoflavone(s) de soja, d'extrait(s) de prunier d'Afrique ou d'un mélange de ces derniers, selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids (utilisation sous forme pure possible dudit produit), de préférence entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

La composition préparée par l'utilisation selon l'invention peut en outre comprendre un excipient pharmaceutiquement, dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable. On peut utiliser tout excipient adapté pour les formes galéniques connues de l'homme de métier, en vue d'une administration par voie topique, orale, entérale ou parentérale, notamment rectale.

En particulier, cet excipient peut être adapté pour l'obtention d'une composition sous forme d'une solution huileuse, d'une émulsion eau-dans-huile, une émulsion

huile-dans-eau, une microémulsion, un gel huileux, un gel anhydre, une crème, une dispersion de vésicules, de microcapsules ou de microparticules, ou encore de gellules ou de capsules molles de gélatine ou végétales.

De préférence, on utilise un excipient adapté pour une administration par voie
5 topique externe ou par voie rectale.

L'effet avantageux d'inhibition de l'activité de la 5 α -réductase de type 1 fourni par l'utilisation selon l'invention permet de destiner la composition ainsi préparée à des traitements thérapeutiques, notamment dermatologiques, et cosmétiques.

Ainsi, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition est
10 destinée au traitement des pathologies et/ou des désordres cutanés liés à une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5 α -réductase de type 1.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'acné.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la
15 composition est destinée au traitement de l'hyper séborrhée.

Enfin, l'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'alopécie.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hirsutisme.

20 La présente invention a encore pour objet une méthode de traitement cosmétique de la peau grasse, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau une composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique tels que définis ci-dessus et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus.

25 L'invention a par ailleurs pour objet une méthode de traitement cosmétique de la chute des cheveux, caractérisée en ce qu'on applique sur le cuir chevelu une composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique tels que définis ci-dessus et les mélanges de ces derniers, tels que décrit ci-dessus.

30 Enfin, l'invention a également pour objet une méthode de traitement cosmétique de l'excès de pilosité, caractérisée en ce qu'on applique sur les zones de la

peau présentant des excès de pilosité une composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique tels que définis ci-dessus et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus.

- 5 En effet, à l'opposé des traitements médicaux hormonaux, ces deux dernières méthodes de traitement cosmétique permettent d'améliorer l'apparence en réduisant de manière visible les phénomènes disgracieux de chute de cheveux liés à l'alopecie et les phénomènes d'excès de pilosités liés à l'hirsutisme.

10 Selon un mode de mise en œuvre préféré de ces méthodes de traitements cosmétiques, ledit produit est présent dans la composition selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids (utilisation sous forme pure possible, sans excipient), de préférence entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

- 15 Avantageusement, la composition cosmétique appliquée selon la méthode cosmétique de l'invention contient en outre au moins un excipient cosmétiquement acceptable tel que décrit ci-dessus.

20 L'invention a encore pour objet l'utilisation d'au moins un composé choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique tels que définis ci-dessus et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus, en tant qu'additif dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal. Cette utilisation alimentaire est de préférence caractérisée en ce que ledit additif est présent dans l'aliment selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, de préférence entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre 25 environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de l'aliment.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer la présente invention et ne doivent en aucun cas être interprétés comme pouvant en limiter la portée.

A moins qu'il n'en soit précisé autrement, les pourcentages indiqués dans les exemples suivants sont des pourcentages en poids.

Enfin, l'invention a également pour objet l'utilisation d'extraits de prunier d'Afrique tels que définis ci-dessus pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase de type 2.

l'invention a également pour objet l'utilisation d'extraits de prunier d'Afrique
5 tels que définis ci-dessus pour la préparation d'une composition destinée au traitement de l'hypertrophie prostatique.

En outre, les extraits de prunier d'Afrique tel que définis ci-dessus peuvent être utilisés pour la préparation d'une composition destinée au traitement et de l'adénome prostatique, et notamment pour la préparation d'une telle composition pour
10 l'administration par voie rectale.

Bulletins analytiques des produits testés dans les exemples

L'extrait d'isoflavones de soja testé, dénommé Genosten 4000, a été fourni par la société Nutrinov.

15

Description : Extrait soluble de soja enrichi en isoflavones obtenu par une technique d'extraction physique, sans utilisation de solvants organiques.

Caractéristiques physico-chimiques :

Densité	400 g/l
Humidité	< 5 %
PH (solution aqueuse à 4%)	8
Solubilité dans l'eau	100 %

20

Composition :

Protéines	11 %
Lipides	< 0.5 %
Glucides	60 %
Sodium	1500 mg/100g
Calcium	< 100 mg/100g
Potassium	5500 mg/100g
Phosphore	300 mg/100g

Composition en isoflavones :

Teneur totale en isoflavones :	4000 +/- 200 mg/100 g
Profil type :	

Daidzine	200
Genistine	280
Malonyldaidzine	900
Malonylgénistine	2080
Daidzéine	30
Génistéine	10

L'extrait de Pygeum Africanum testé a été fourni par la société Euromed.

5 **Description :** Extrait lipido-stérolique de Pygeum Africanum issu de l'écorce de pygeum.

Caractérisitiques physico-chimiques :

Aspect	pâte visqueuse de couleur marron prononcé, avec une odeur caractéristique
Solubilité	Insoluble dans l'eau, soluble dans le chloroforme
Perte à la dessiccation	3 % max.
Cendres	0.4 % max.
Absorption UV	Maxima à 242 ; 282 et 320 nm

Composition chimique

Indice d'acide 39 mg KOH/g

Composition en acides gras (%)

C12:0	0.3
C16:0	44.6
C18:0	5.6
C18:1	36.6
C18 :2	9.8
C18 :3	0.6
Teneur en insaponifiable	17.6 %
Stérols	14.7

Exemple 1 : Evaluation de l'activité inhibitrice sur l'activité de la 5 α -réductase par mesure du taux de 5-dihydrotestostérone formée à partir de la testostérone par les cellules DU145.

5 1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel

Les cellules prostatiques DU145 sont issues d'une lignée tumorale obtenue à partir d'un carcinome de la prostate (N° ATCC HTB 81). Le milieu MEM (réf.0410265), la glutamine et la gentamycine viennent de chez Gibco. Le sérum de
10 veau fœtal (SVF) vient de chez DAP et est utilisé décomplémenté (45 mm à 56°C). les plastiques servant à la culture (boîtes et plaques) viennent de chez Costar. La testostérone vient de chez Sigma.

1.2 Méthode

15 1.2.1 Préparation des gammes de produits

Une solution mère en éthanol à 10 mg/ml est préparée à partir de chacun des produits testés.

La gamme de concentration utilisée pour les expériences est la suivante : 0, 5, 10, 50, 100 et 500 microgrammes/ml. (Dilution effectuée dans le milieu de culture).

20 Le volume d'extrait ajouté par puits étant de 20 microlitres/puits, les solutions à préparer sont concentrées 50X.

Préparation de la Testostérone

Une solution mère de testostérone à 10 mM est préparée dans l'éthanol. Au
25 moment de son utilisation, cette solution est diluée au 1:1000 dans le milieu de culture et 10 microlitres sont ajoutés par puits.

1.2.2. Expérience d'inhibition de la 5 α -réductase des DU 145

Les cellules prostatiques DU145 sont cultivées à 37°C, 5% CO₂ dans un milieu
30 MEM contenant de la glutamine (2mM), de la gentamycine (50 microgrammes/ml) et

10% de SVF. Leur taux de sous-culture est de 1:10.

Avant de lancer l'expérimentation, les cellules sont mises en culture dans des plaques 6 puits à raison de 2.10^5 DU145 par puits/1 ml de milieu ne contenant que 1% de SVF. Les cellules sont maintenues 3 jours à 37°C, 5% CO₂. Le jour de l'expérience, le milieu de culture contenu dans les puits est éliminé et remplacé par du milieu neuf contenant 1% de SVF. La testostérone (0,1 micromolaire final) ainsi que les extraits aux différentes concentrations sont ajoutés au milieu à raison de 10 et 20 microlitres/puits respectivement. (Les puits "contrôles" correspondent à des cellules incubées en présence de testostérone et d'un équivalent Ethanol. Ceci permet de soustraire l'effet du solvant sur les cultures et de déterminer le pourcentage de DHT formée en absence d'inhibiteur). Les cellules sont alors incubées à 37°C, 5% CO₂. Au bout de 3 heures, les surnageants de culture sont collectés et congelés à -80°C jusqu'au dosage.

15 **Mesure du taux de DHT formée**

Principe: extraction des produits lipophiles par l'éther, concentration des échantillons en DHT par chromatographie d'affinité et dosage radio-immunologique

Préparation des échantillons

- Après avoir agité au vortex les prélèvements, introduire les échantillons dans des
20 flacons "SEPEX"
- Ajouter dans chaque tube 0,1 ml de la solution radioactive "³H-Rdt" (pour évaluation du rendement d'extraction). Boucher les flacons, les agiter un par un au vortex.
- Laisser reposer 30 min à température ambiante. Puis agiter de nouveau chaque flacon au vortex.
- 25 - Ajouter dans chaque flacon : 5 ml d'éther éthylique.
- Boucher les flacons et les agiter manuellement de façon énergique. Laisser décanter quelques minutes.
- Congeler les phases aqueuses à -30°C, pendant au moins 1 heure.
- Recueillir la phase étherée dans un tube à essai en boro-silicate de 5 ml
30 correspondant.

- Evaporer totalement la phase étherée à l'aide du système évaporateur + bain-marie à 37°C.

Séparation de la DHT

- 5 • Préparation des colonnes : Préparer les colonnes dans des pipettes de culture en verre de 5 ml avec 10 cm de chromatolithe A.
- Rinçage des colonnes : 3 ml d'iso-octane pur combitips (3 fois), en laissant couler par simple gravité.
- Elution des extraits étherés secs
- 10 - Chaque extrait sec est repris par 1 ml d'iso-octane pur, vortexer vigoureusement. Attendre 15 min à température ambiante. Réagiter au vortex.
- Lorsque les 3 ml d'iso-octane (lavage des colonnes) sont élués, transvaser les extraits étherés secs repris par l'iso-octane sur la colonne. Laisser éluer.
- Rincer chaque tube "extrait sec" avec 1 ml d'iso-octane pur combitips, vortexer vigoureusement. Attendre 15 min à température ambiante. Réagiter au vortex et transvaser dans la colonne comme précédemment.
- 15 - Laver par 4 ml d'iso-octane pur.
- Recueil de la DHT
- Préparer le solvant d'élution (mélange à 6% iso-octane/acétate d'éthyl: 94/6 (v-v))
- 20 -Eluer par 6 ml (pipette) de ce mélange.
- Recueillir l'éluat DHT dans les tubes à essais en boro-silicate de 5 ml identifiés.
- Traitement de l'éluat DHT : Evaporer le solvant de l'éluat à l'aide du système évaporateur-bain-marie (37°C)

25 Dosage RIA

- Protocole de distribution : Reprendre les échantillons par 0,5 ml de tampon RC, le Blanc par 1 ml de tampon Rcet, les Contrôles par 0,5 ml de tampon RC. Placer à l'étuve à 37°C 15 min Agiter de nouveau les tubes au sortir de l'étuve (1 min).
- Dans des tubes à hémolyse en verre identifiés de 5 ml, mettre dans l'ordre:

* **Tampon** : Activité Totale (AT): 0,7 ml de tampon RC, Activité Non Spécifique (N): 0,2 ml de tampon RC, Gamme : seul le point 0 de la gamme (noté B0) comporte 0,1 ml de tampon RC,

* **Solution étalon** (1000 à 7,8 pg/tube) : 0,1 ml de la solution étalon respective.

5 * 0,1 ml d'**extrait sec** repris dans le tampon

- Puis, distribuer l'**anti-sérum** : 0,1 ml dans tous les tubes sauf AT et N.

- Puis, distribuer la **solution de dosage "3HD"** : 0,1 ml dans tous les tubes.

- Vortexer et recouvrir d'un parafilm.

- Incubation à 4°C, pendant 1h30 minimum (24 h. maximum).

10 • **Préparation du charbon-dextran** : Mettre la suspension de charbon-dextran dans un bécher, puis, dans un bain d'eau glacé à 4°C, pendant au moins 1h30.

• **Rendement de purification en DHT**

- Dans 6 petites fioles à scintillation (3 par série) déposer : 0,4 ml de tampon RC + 0,1 ml de la solution "3H-Rdt" (flacon du premier jour au réfrigérateur). Blancs : mettre

15 0,5 ml d'extrait sec reconstitué pour le blanc. Echantillons et contrôles : mettre 0,25 ml de tampon RC + 0,25 ml d'extrait.

- Ajouter 5 ml de liquide à scintillation dans toutes les fioles.

Séparation de la DHT libre de celle liée à l'anticorps

20 - Mettre la suspension de charbon-dextran sous agitation magnétique, dans une bassine d'eau glacée.

- Ajouter 0,5 ml de charbon-dextran dans tous les tubes sauf AT en 2 min maximum.

- Vortexer, remettre les tubes dans l'eau glacée. Attendre 10 min exactement. Centrifuger à 4°C, 3400 rpm, pendant 11 min

25 - Pipeter 0,5 ml de chaque surnageant (y compris AT) dans une petite fiole de comptage

- Ajouter 5 ml de liquide scintillant. Agiter, laisser s'équilibrer 30 min à température ambiante.

- Mettre à compter 2 min avec le compteur β (Beckman, LS 6000 SE).

2. Résultats - Evaluation de la conversion de la testostérone en 5-dihydrotestostérone par les cellules DU 145 – Détermination des IC 50

Tableau 4

Produit testé	IC 50 (µg/ml)
Extrait de Pygeum Africanum	203
Sereoa repens	60

3. Conclusions

L'extrait de serenoa Repens, choisi comme substance de référence, inhibe l'activité de la 5-alpha réductase. Ce résultat valide donc le test.

L'extrait de Pygeum Africanum testé est actif dans l'inhibition de la 5-alpha réductase.

10

Exemple 2 : Evaluation in vitro de l'activité de la 5- α réductase sur la conversion de la testostérone en 5 α -dihydrotestostérone dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux.

15 Abréviations utilisées dans ce qui suit :

^3H : tritium

CCM : chromatographie en couche mince

Ci : Curie

DMSO : diméthyl sulfoxyde

20 M199 : appellation donnée à un milieu de culture standard

MCF : milieu de culture des fibroblastes

MEM : appellation donnée au milieu de culture, *Minimum Essential medium*

MIF : milieu d'incubation des fibroblastes

25 Rf : facteur de rétention relatif

SVF : sérum de veau foetal

5 α -DHT : 5 α -dihydrotestostérone

On se propose d'évaluer l'effet des produits tels qu'un extrait d'isoflavones de soja (Genosten 4000, décrit ci-dessus), de la génistéine et de la génistine (isoflavones purifiées, produits commerciaux Sigma), d'un extrait de *Pygeum Africanum*, d'un extrait de *Serenoa Repens* choisi comme référence, sur l'activité de la 5 α -réductase.

- 5 Un modèle *in vitro* de cultures de fibroblastes dermiques humains normaux a été retenu.

1. Matériels et méthodes

1.1 Produits à l'essai, produit de référence, et réactifs

- 10 Les produits à l'essai ont été fournis par EXPANSCIENCE et ont été conservés à +4°C jusqu'au moment de leur utilisation.

La testostérone radioactive (marquée au tritium en position 1, 2, 6 et 7, activité spécifique 79 Ci/mmol) était fournie par AMERSHAM, la testostérone non-radiomarquée était fournie par SIGMA.

- 15 Les réactifs de qualité analytique, provenaient de chez SIGMA, MERCK, BDH, ALDRICH ou CARLO ERBA sauf indication contraire.

1.2 Système d'essai

- 20 Le milieu de culture des fibroblastes (MCF) était constitué par du MEM/M199 (3:1, v/v) additionné de pénicilline (50 UI/ml), de streptomycine (50 μ g/ml), de bicarbonate de sodium (0,2 %, p/v) et de SVF (10 %, v/v).

- 25 Le système d'essai était constitué de fibroblastes dermiques humains normaux cultivés en monocouche. Les fibroblastes ont été isolés à partir d'un résidu de plastie abdominale réalisée chez une femme de 51 ans (sujet BIOPREDIC n°I0013). Les cellules ont été utilisées au cinquième passage, elles ont été cultivées jusqu'à confluence des monocouches dans le milieu MCF à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

Chaque condition expérimentale a été testée en triplicate.

1.4 Evaluation des effets

Après la période d'incubation, les cellules ont été soumises à l'action des
5 ultrasons dans le milieu MIF. Les lysats cellulaires ainsi obtenus ont été extraits par du
dichlorométhane. Après évaporation, les résidus secs ont été repris dans du méthanol
et ont été déposés sur des plaques de silice 60F₂₅₄ (MERCK, référence 5554).

Des standards non radiomarqués, la testostérone, la 5 α -dihydrotestostérone et
l'androstènedione, ont été déposés sur chacune des plaques.

10 Le solvant de migration était un mélange de dichlorométhane et d'éther (7:3,
v/v) A la fin de la migration, les plaques de silices ont été lues à l'aide d'un scanner de
radioactivité BERTHOLD.

Les standards non radiomarqués ont été mis en évidence par pulvérisation
d'acide sulfurique à 5 % (v/v) sur les plaques de chromatographie chauffées ensuite à
15 100°C pendant 10 minutes.

La comparaison des R_f (facteur de rétention relatif) déterminés pour les
standards avec ceux obtenus pour les différents métabolites radioactifs a permis
l'identification de ces derniers.

La métabolisation de la testostérone en 5 α -dihydrotestostérone dans les
20 différentes conditions expérimentales a été calculée : les résultats (aires des pics de 5 α -
dihydrotestostérone comptés par le scanner BERTHOLD) ont été exprimés en pmoles
de 5 α -dihydrotestostérone formées par puits de culture. Ils ont aussi été exprimés en
pourcentage de l'activité 5 α -réductase présente dans le groupe 'témoin DMSO'.

25 1.5 - Traitement des données

Les groupes de données (groupe témoin et groupes traités) ont été traités par
une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1, $p < 0,05$), suivie par un test de
DUNNETT ($p < 0,05$). L'effet des produits à l'essai et du produit de référence a été
comparé au groupe 'témoin DMSO'. Les effets des produits à l'essai ont été comparés
30 entre eux par une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA 2, $p < 0,05$, facteur 1
= concentration et facteur 2 = traitement).

2. Résultats et discussion

On se reportera au paragraphe 3 suivant pour les tableaux de résultats détaillés.

5 2.1. Génistine et génistéine

Dans les échantillons 'témoin DMSO' (0,1% v/v), la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 11,40 +/- 0,75 pmoles de 5 α -DHT formées en 24 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.1). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

10 La génistine, testée à 0,1 ; 1 et 10 μ g/ml, n'avait pas d'effet d'inhibition significatif ($p < 0,05$) sur l'activité de la 5 α -réductase. A 100 μ g/ml, ce produit inhibait significativement ($p < 0,05$) de 32% l'activité de la 5 α -réductase.

 La génistéine, testée à 0,1 ; 1 et 10 μ g/ml, inhibait significativement ($p < 0,05$) de 32% ; 33% et 31% respectivement l'activité de la 5 α -réductase. A 100 μ g/ml, elle inhibait significativement ($p < 0,05$) de 61% l'activité de la 5 α -réductase.

En conclusion, la génistéine est nettement plus active que la génistine.

2.2 Extrait d'isoflavones de soja

20 Dans les cultures témoins, la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 9,71 +/- 0,77 pmoles de 5 α -DHT formées en 22 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.2). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

 L'extrait d'isoflavones de soja, testé à 10 et 100 μ g/ml, inhibait respectivement de 22 et 17% l'activité de la 5 α -réductase.

 L'extrait de *Serenoa Repens*, testé à 10 et 100 μ g/ml, inhibait respectivement de 15 et 35% l'activité de la 5 α -réductase. A 1 μ g/ml, il n'avait pas d'effet.

 En conclusion, dans les conditions expérimentales retenues, les extraits d'isoflavones de soja et de *Serenoa Repens* (référence) inhibaient l'activité de la 5 α réductase. L'extrait d'isoflavones de soja présente une activité d'inhibition de la 5 α réductase supérieure à celle de l'extrait de *Serenoa Repens*.

2.3. Extrait de *Pygeum Africanum*

Dans les cultures témoins, la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 9,71 +/- 0,77 pmoles de 5 α -DHT formées en 22 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.3.). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

Les effets des produits à l'essai ont été comparés à ceux obtenus en présence du finastéride, utilisé comme produit de référence en plus de l'extrait de *Serenoa Repens*.

Le finastéride, testé à 3 et 30 ng/ml, inhibait respectivement l'activité de la 5 α -réductase de 36 et 65% (tableau paragraphe 3.3.1). Ce résultat était attendu et valide l'étude.

L'extrait de *Serenoa Repens*, testé à 10 et 100 μ g/ml, inhibait respectivement de 15 et 35% l'activité de la 5 α -réductase. A 1 μ g/ml, il n'avait pas d'effet (tableau paragraphe 3.3.2).

L'extrait de *Pygeum Africanum*, testé à 1, 10 et 100 μ g/ml, inhibait respectivement de 33, 22 et 30% l'activité de la 5 α -réductase (tableau paragraphe 3.3.2).

En conclusion, les extraits de *Serenoa Repens* et de *Pygeum Africanum* inhibaient de façon quasi identique l'activité de la 5 α réductase.

3. Tableaux de résultats détaillés

3.1. Effet de la génistine et de la génistéine sur l'activité de la 5 α -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux, après 24 heures d'incubation

5

Produit	DMSO 1% (v/v)	Concentration (μ g/ml)			
		0,1	1	10	100
Génistine	10,56	11,72	9,80	13,64	7,12
	12,00	11,16	9,88	14,12	8,84
	11,64	9,36	10,16	12,64	7,20
	11,40\pm0,75	10,75\pm1,23	9,95\pm0,19	13,47*\pm0,76	7,72*\pm0,97
	<i>100</i>	<i>94</i>	<i>87</i>	<i>118</i>	<i>68</i>
Génistéine	10,56	8,04	7,52	7,96	4,24
	12,00	7,52	8,56	8,68	4,96
	11,64	7,72	7,00	6,88	4,16
	11,40\pm0,75	7,76*\pm0,26	7,69*\pm0,79	7,84*\pm0,91	4,45*\pm0,44
	<i>100</i>	<i>68</i>	<i>67</i>	<i>69</i>	<i>39</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 α -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe 'DMSO 0,1% (v/v)'

* : moyenne significativement différente du groupe 'DMSO 0,1% (v/v)'

3.2 Effet des extraits de *Serenoa Repens* et d'isoflavones de soja (Genosten 4000) sur l'activité de la 5 α -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux après 22 heures d'incubation

5

Produit	DMSO	Concentration (μ g/ml)		
	1% (v/v)	1	10	100
Serenoa Repens	8,00	7,72	6,84	5,48
	8,92	9,20	7,48	5,68
	8,68	8,08	7,52	5,44
	8,53\pm0,48	8,33\pm0,77	7,28\pm0,38	5,53\pm0,13
	<i>100</i>	<i>98</i>	<i>85</i>	<i>65</i>
Extrait d'isoflavones de soja (Genosten 4000)	8,00		6,24	7,04
	8,92		6,52	7,12
	8,68		7,12	7,12
	8,53\pm0,48		6,63\pm0,45	7,09\pm0,05
	<i>100</i>		<i>78</i>	<i>83</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 α -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ($p < 0,05$)

3.3. Effet du finastéride et des extraits de *Serenoa Repens* et *Pygeum Africanum* sur l'activité de la 5 α -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux après 22 heures d'incubation

5

3.3.1. Finastéride

Témoin	DMSO 1% (v/v)	Finasteride (ng/ml)	
		3	30
9,24	8,00	5,52	2,92
9,28	8,92	5,84	2,92
10,60	8,68	5,00	3,00
9,71*\pm0,77	8,53\pm0,48	5,45*\pm0,42	2,95*\pm0,05
<i>114</i>	<i>100</i>	<i>64</i>	<i>35</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 α -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ($p < 0,05$)

3.3.2. Extraits de *Serenoa Repens* et *Pygeum Africanum*

Produit	DMSO 1% (v/v)	Concentration (μ g/ml)		
		1	10	100
Serenoa Repens	8,00	7,72	6,84	5,48
	8,92	9,20	7,48	5,68
	8,68	8,08	7,52	5,44
	8,53 \pm 0,48	8,33 \pm 0,77	7,28* \pm 0,38	5,53* \pm 0,13
	<i>100</i>	<i>98</i>	<i>85</i>	<i>65</i>
Pygeum Africanum	8,00	5,00	6,36	5,84
	8,92	5,64	7,28	6,52
	8,68	6,40	6,20	5,60
	8,53 \pm 0,48	5,68* \pm 0,70	6,61* \pm 0,58	5,99* \pm 0,48
	<i>100</i>	<i>67</i>	<i>78</i>	<i>70</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 α -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ($p < 0,05$)

Exemple 3 : composition d'un shampoing pour cheveux gras.

5		%
	Aqua	q.s.p. 100,000
	Sodium Lauroamphoacetate	14,000
	Coco-Glucoside	10,000
	Magnesium Laureth Sulfate	5,000
10	PEG-40 Glyceryl Cocoate	3,450
	PEG-150 Distearate	1,850
	Sodium Coceth Sulfate	1,050
	Citric Acid	0,450
	Disodium EDTA	0,300
15	Parfum	0,200
	Methylparaben	0,160
	Butylparaben	0,060
	Isoflavone de Soja	1,000
	Pygeum Africanum	0,500
20		

Exemple 4 : composition d'une émulsion pour peau grasse

		%
25	Aqua	q.s.p. 100
	Di-C12-13 Alkyl Malate	10,000
	Glycérine	5,000
	PEG-5 Glyceryl Stearate	3,500
	Glyceryl Stearate	1,500
30	Ceresin	1,500
	PEG-40 Stearate	1,500
	Sorbitan Stearate	1,000
	Zinc PCA	1,000
	Cetyl Alcohol	1,000
35	Polyacrylamide	1,000
	C13-14 Isoparaffin	0,500
	Parfum	0,500
	Piroctone Olamine	0,300
	Laureth-7	0,125
40	Sodium Polyacrylate	0,065
	Citrate de glycérides de palme hydrogénés	0,040
	Isoflavone de Soja	2,000

Exemple 5 : composition d'une émulsion pour peau grasse

		%
5	Aqua	q.s.p. 100
	Di-C12-13 Alkyl Malate	10,000
	Glycérine	5,000
	PEG-5 Glyceryl Stearate	3,500
	Glyceryl Stearate	1,500
10	Ceresin	1,500
	PEG-40 Stearate	1,500
	Sorbitan Stearate	1,000
	Zinc PCA	1,000
	Cetyl Alcohol	1,000
15	Polyacrylamide	1,000
	C13-14 Isoparaffin	0,500
	Parfum	0,500
	Piroctone Olamine	0,300
	Laureth-7	0,125
20	Sodium Polyacrylate	0,065
	Citrate de glycérides de palme hydrogénés	0,040
	Pygeum Africanum	1,000
	Acide Salicylique	1,000

25

30

35

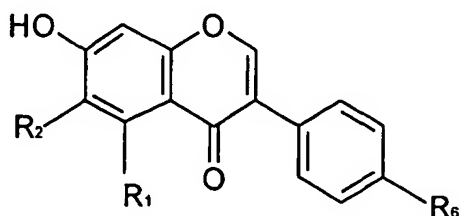
Revendications

1. Utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, les extrait de prunier d'Afrique étant caractérisés en ce qu'ils présentent une répartition
5 en acides gras de 30 à 40% en acide oléique, de 7 à 12% en acide linoléique, de 40 à 55% en acide palmitique et inférieur à 3% en acide linoléique, en ce que la teneur en stérols est comprise entre 13 et 18% et en ce que l'indice global de l'extrait est inférieur à 45, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase de type 1.

10 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les isoflavones selon la revendication 1 sont d'origine naturelle, synthétique ou un mélange d'isoflavones d'origine naturelle et synthétique.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les isoflavones de forme aglycone de formule (I)

15



20

dans laquelle R1 représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxy, R2 représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthoxy et R6 représente un groupe hydroxy ou un groupe méthoxy.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes,
25 caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les isoflavones synthétiques ou d'origine naturelles du groupe constitué par les génistine, daidzine, glycitine, acétyldaidzine, acétylgénistine, acétylglycitine, malonyldaidzine, malonylgénistine, malonylglycitine, la 2,4,4'-trihydroxydeoxybenzoïne (THB), la daidzéine, la génistéine, la glycitéine, la formononectine, la biochanine A, la génistéin-4'-O-glucoside, la 2'-hydroxygénistéin-7-O-glucoside, la génistéin-C-8-glucoside et les
30 mélanges de ces derniers.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le produit est choisi dans le groupe constitué par la génistine, la génistéine et les mélanges de ces derniers.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes,
5 caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du soja.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du lupin.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le produit est utilisé selon une proportion comprise entre
10 environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition préparée comprend un excipient pharmaceutiquement, dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'excipient est
15 adapté pour une administration par voie topique externe ou par voie rectale.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement des pathologies et/ou des désordres cutanés liés à une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la
20 5 α -réductase de type 1.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'acné.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hyperséborrhée.

14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée
25 en ce que la composition est destinée au traitement de l'alopécie.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hirsutisme.

16. Méthode de traitement cosmétique de la peau grasse, caractérisée en ce
30 qu'on applique sur la peau une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

17. Méthode de traitement cosmétique de la chute des cheveux, caractérisée en ce qu'on applique sur le cuir chevelu une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

5 18. Méthode de traitement cosmétique de l'excès de pilosité, caractérisée en ce qu'on applique sur les zones de la peau présentant des excès de pilosité une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10 19. Méthode de traitement cosmétique selon l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisée en ce que ledit produit est présent dans la composition selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

20. Méthode selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisée en ce que la composition cosmétique contient en outre au moins un excipient cosmétiquement acceptable.

15 21. Utilisation d'au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 7, en tant qu'additif dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal.

20 22. Utilisation selon la revendication 21, caractérisée en ce que le produit est présent dans l'aliment selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de l'aliment.

23. Utilisation d'extraits de prunier d'Afrique tels que définis à la revendication 1 pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 α -réductase de type 2.

25 24. Utilisation d'extraits de prunier d'Afrique tels que définis à la revendication 1 pour la préparation d'une composition destinée au traitement de l'hypertrophie prostatique.

25. Utilisation d'extraits de prunier d'Afrique tels que définis à la revendication 1 pour la préparation d'une composition destinée au traitement de l'adénome prostatique.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/352 A61K35/78 A61P13/08 A61P17/10 A61P17/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 22728 A (ARCH DEV CORP ;LIAO SHUTSUNG (US); HIIPAKKA RICHARD A (US)) 14 May 1999 (1999-05-14) page 2, line 25 -page 3, line 30 claims 1-7 Tableau 1, (compounds 10,17) Tableau 7, (compounds 23,31) page 10, line 1 -page 15, line 26 page 21, line 31 -page 22, line 4 ---	1-5,8-22
X	JP 10 059995 A (FUJIMOTO BROS:KK) 3 March 1998 (1998-03-03) abstract --- -/--	1,2,8-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 May 2001

Date of mailing of the international search report

01/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Veronese, A

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1990-278125 XP002149039 "5-Alfa reductase inhibitors contg. iso:flavone cpd." & JP 02 193920 A (KAO CORPORATION) abstract</p> <p>---</p>	1-3,8,9, 11
X	<p>US 5 543 146 A (PEREZ CARLOS) 6 August 1996 (1996-08-06)</p> <p>column 2, line 11-16 column 3, line 22-28 claims; examples</p> <p>---</p>	1,2, 8-11,24, 25
X	<p>US 5 972 345 A (CHIZICK STEPHEN ET AL) 26 October 1999 (1999-10-26)</p> <p>column 2, line 19-40; claims</p> <p>---</p>	1,2, 8-11,14, 17,19
X	<p>DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1986-129442 XP002149040 "Hair tonic preparation showing hair- growing effects containing extract bark prunus africana." & JP 61 068408 A (POLA KASEY KOGYO KK), 1986 abstract</p> <p>---</p>	1-3, 8-11,16, 19,21-24
P,X	<p>SHIMIZU, KUNIYOSHI ET AL: "The 5.alpha.-reductase inhibitory components from heartwood of Artocarpus incisus. Structure-activity investigations" PLANTA MED. (2000), 66(1), 16-19, XP000951500 the whole document</p> <p>---</p>	1,2,8,9, 11,12, 14-16, 19-21
X	<p>REYNOLDS: MARTINDALE: THE EXTRA PHARMACOPOEIA 31 EDITION, vol. 31, 1996, XP002167385 London page 1493, column 1</p> <p>-----</p>	1,2, 8-11,24, 25

Continuation of box I.2

The definitions "isoflavones" and "African plum" mentioned in Claim 1 concern a very wide variety of compounds/products. However, a support basis can be found for only a very limited number of said claimed compounds/products. In the present case, the claims are so lacking in support basis and the disclosure is so limited that it is not possible to carry out any meaningful search covering the whole spectrum claimed. Consequently, the search was limited to those parts of the claims which are supported and disclosed, that is those parts concerning compounds mentioned in Claim 4, in the description on pages 5-7 and to the extracts of African plum called "Pygeum" and "Prunus Africana".

The definition "designed to inhibit 5- α activity reductase" mentioned in Claim 1 does not define diseases for which said compositions are intended. Consequently, the search was limited to diseases mentioned in Claims 12-18.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the line of conduct adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examination Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter in respect of which no search has been carried out. That attitude will remain unchanged, notwithstanding whether the claims have been modified or not, either after the report has been received, or during any procedure under Chapter II.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9922728	A	14-05-1999	AU	1289899 A	24-05-1999
			EP	1027045 A	16-08-2000
JP 10059995	A	03-03-1998	NONE		
JP 2193920	A	31-07-1990	JP	2791673 B	27-08-1998
US 5543146	A	06-08-1996	CA	2174608 A	13-03-1997
US 5972345	A	26-10-1999	NONE		
JP 61068408	A	08-04-1986	JP	1810335 C	27-12-1993
			JP	5019525 B	17-03-1993

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K31/352 A61K35/78 A61P13/08 A61P17/10 A61P17/14		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) CHEM ABS Data, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 22728 A (ARCH DEV CORP ;LIAO SHUTSUNG (US); HIIPAKKA RICHARD A (US)) 14 mai 1999 (1999-05-14) page 2, ligne 25 -page 3, ligne 30 revendications 1-7 Tableau 1, (compounds 10,17) Tableau 7, (compounds 23,31) page 10, ligne 1 -page 15, ligne 26 page 21, ligne 31 -page 22, ligne 4 ---	1-5,8-22
X	JP 10 059995 A (FUJIMOTO BROS:KK) 3 mars 1998 (1998-03-03) abrégé --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1,2,8-12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div style="width: 45%;"> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="width: 50%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">15 mai 2001</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">01/06/2001</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Veronese, A</div>

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1990-278125 XP002149039 "5-Alfa reductase inhibitors contg. iso:flavone cpd." & JP 02 193920 A (KAO CORPORATION) abrégé</p> <p>---</p>	1-3,8,9, 11
X	<p>US 5 543 146 A (PEREZ CARLOS) 6 août 1996 (1996-08-06)</p> <p>colonne 2, ligne 11-16 colonne 3, ligne 22-28 revendications; exemples</p> <p>---</p>	1,2, 8-11,24, 25
X	<p>US 5 972 345 A (CHIZICK STEPHEN ET AL) 26 octobre 1999 (1999-10-26)</p> <p>colonne 2, ligne 19-40; revendications</p> <p>---</p>	1,2, 8-11,14, 17,19
X	<p>DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1986-129442 XP002149040 "Hair tonic preparation showing hair- growing effects containing extract bark prunus africana." & JP 61 068408 A (POLA KASEY KOGYO KK), 1986 abrégé</p> <p>---</p>	1-3, 8-11,16, 19,21-24
P,X	<p>SHIMIZU, KUNIYOSHI ET AL: "The 5.alpha.-reductase inhibitory components from heartwood of Artocarpus incisus. Structure-activity investigations" PLANTA MED. (2000), 66(1), 16-19, XP000951500 le document en entier</p> <p>---</p>	1,2,8,9, 11,12, 14-16, 19-21
X	<p>REYNOLDS: MARTINDALE: THE EXTRA PHARMACOPOEIA 31 EDITION, vol. 31, 1996, XP002167385 London page 1493, colonne 1</p> <p>-----</p>	1,2, 8-11,24, 25

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Les définitions "isoflavones" et "prunier d' Afrique" présentes dans la revendication 1 ont trait à une très grande variété de composés/produits. Un fondement et/ou un exposé ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés/produits revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés mentionnés dans la revendication 4, dans les description à la page 5-7 et aux extraits de prunier d'Afrique dénommés "Pygeum" et "Prunus Africana".

La définition "composition destinée à inhiber l' activité de la 5 alfa réductase" présente dans la revendication 1 ne définit pas les maladies pour lesquelles les compositions sont destinées. Par conséquent, la recherche a été limitée aux maladies mentionnés dans les revendications 12-18.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9922728	A	14-05-1999	AU	1289899 A	24-05-1999
			EP	1027045 A	16-08-2000

JP 10059995	A	03-03-1998	AUCUN		

JP 2193920	A	31-07-1990	JP	2791673 B	27-08-1998

US 5543146	A	06-08-1996	CA	2174608 A	13-03-1997

US 5972345	A	26-10-1999	AUCUN		

JP 61068408	A	08-04-1986	JP	1810335 C	27-12-1993
			JP	5019525 B	17-03-1993

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.